

56. savetovanje Srpskog hemijskog društva

KNJIGA RADOVA

56th Meeting of
the Serbian Chemical Society

PROCEEDINGS

Niš 7. i 8. juni 2019.
Niš, Serbia, June 7-8, 2019



Srpsko hemijsko društvo



56. SAVETOVANJE SRPSKOG HEMIJSKOG DRUŠTVA

KNJIGA RADOVA

56th MEETING OF THE SERBIAN CHEMICAL SOCIETY Proceedings

Niš 7. i 8. juni 2019.
Niš, Serbia, June 7-8, 2019

54(082)(0.034.2)
577.1(082)(0.034.2)
66(082)(0.034.2)
66.017/.018(082)(0.034.2)
502/504(082)(0.034.2)

СРПСКО хемијско друштво. Саветовање (56 ; 2019 ; Ниш)

Knjiga radova [Elektronski izvor] = Proceedings / 56. savetovanje Srpskog hemijskog društva, Niš, 7. i 8. juni 2019. = 56th Meeting of the Serbian Chemical Society, Niš, Serbia, June 7-8, 2019 ; [urednici, editors Dušan Sladić, Niko Radulović, Aleksandar Dekanski]. - Beograd : Srpsko hemijsko društvo = Serbian Chemical Society, 2019 (Beograd : Razvojno-istraživački centar grafičkog inženjerstva TMF). - 1 elektronski optički disk (CD-ROM) ; 12 cm

Sistemski zahtevi: Nisu navedeni. - Dostupno i na: www.shd.org.rs/56shd.pdf. - Nasl. sa naslovne strane dokumenta. - Tekst cir. i lat. - Tiraž 6. - Bibliografija uz svaki rad. - Abstracts ; Apstrakti. - Registar.

ISBN 978-86-7132-074-0

a) Хемија -- Зборници б) Биохемија -- Зборници в) Технологија -- Зборници г) Наука о материјалима -- Зборници д) Животна средина -- Зборници

COBISS.SR-ID 276611852

56. SAVETOVANJE SRPSKOG HEMIJSKOG DRUŠTVA

Niš, 7. i 8. juni 2019.

KNJIGA RADOVA

56th MEETING OF THE SERBIAN CHEMICAL SOCIETY

Niši Sad, Serbia, June 7-8, 2019

PROCEEDINGS

Izdaje / Published by

Srpsko hemijsko društvo / Serbian Chemical Society

Karnegijeva 4/III, 11000 Beograd, Srbija

tel./fax: +381 11 3370 467; www.shd.org.rs, E-mail: Office@shd.org.rs

Za izdavača / For Publisher

Vesna Mišković STANKOVIĆ, predsednik Društva

Urednici / Editors

Dušan SLADIĆ

Niko RADULOVIĆ

Aleksandar DEKANSKI

Dizajn korica, slog i kompjuterska obrada teksta

Cover Design, Page Making and Computer Layout

Aleksandar DEKANSKI

OnLine publikacija / OnLine publication

www.shd.org.rs/56shd.pdf

ISBN 978-86-7132-074-0

Naučni Odbor
Scientific Committee

Dušan Sladić, predsednik/chair
Vesna Mišković-Stanković
Niko Radulović
Gordana Stojanović
Snežana Tošić
Aleksandra Pavlović
Aleksandra Zarubica
Tatjana Anđelković
Miloš Đuran
Ljiljana Jovanović
Marija Sakač
Janoš Čanadi
Velimir Popsavin
Mirjana Popsavin
Katarina Anđelković
Dragica Trivić
Maja Gruden Pavlović
Tanja Ćirković Veličković
Maja Radetić



Organizacioni Odbor
Organising Committee

Niko Radulović, predsednik/chair
Aleksandar Dekanski
Danijela Kostić
Dragan Đorđević
Emilija Pecev Marinković
Marija Genčić
Ana Miltojević
Milan Stojković
Milan Nešić
Milica Nikolić
Marko Mladenović
Dragan Zlatković
Miljana Đorđević
Milena Živković
Sonja Filipović
Milica Stevanović
Jelena Aksi

Savetovanje podržalo / Supported by



Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije
Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia

*Ova knjiga sadrži **20 radova**
(obima od najmanje četiri stranice)
pojedinih saopštenja prezentovanih na
56. savetovanju Srpskog hemijskog društva.*

*This book contains **20 Proceedings**
of some of the contributions presented at
the 56th Meeting of the Serbian Chemical Society.*

***In situ* bioremedijacija sedimenta kontaminiranog mineralnim uljem**

Aleksandra Žerađanin, Nikoleta Lugonja, Kristina Joksimović*, Jelena Avdalović,
Gordana Gojgić-Cvijović, Vladimir Beškoski**, Miroslav M. Vrvic***

Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu, Srbija

**Inovacioni centar, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

***Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu*

****Brem group, Beograd*

Uvod

Povećana emisija zagađivača u životnu sredinu utiče na celokupan ekosistem i na kvalitet zemljišta, sedimenta i podzemnih voda. Kontaminiran sediment predstavlja potencijalni dugotrajni izvor zagađenja koje negativno utiče na živi svet i zdravlje ljudi. Mnogi kontaminanti imaju tendenciju akumulacije i adsorpcije u sedimentu^{1,2}. Veoma značajnu ulogu u sorpciji i akumulaciji u sedimentu ima organska frakcija, koja obuhvata jedinjenja ugljenika koja potiču od biljnih i životinjskih ostataka³.

Nafta i naftni derivati kao što su benzin i mineralna ulja (dizel i mazut) mogu dospeti u zemljište, sediment i vodu i predstavljaju rizik za životnu sredinu i čoveka⁴. Do zagađenja može doći tokom eksploatacije, transporta i skladištenja nafte, ali i pri akcidentalnim izlivanjima. Izliveni u sediment imaju veoma toksičan efekat na organizme koji žive u njemu. Migracijom kroz sediment kontaminanti mogu dospeti do podzemnih voda i postati izvor sekundarnog zagađenja^{2,5}.

Bioremedijacija je zelena tehnologija koju čini skup postupaka, kojima se sanira zagađeno područje u životnoj sredini do prihvatljivih i zakonom propisanih koncentracija za dati zagađivač. Bioremedijacija koristi prirodnu sposobnost mikroorganizama da rastu na ugljovodoničnim supstratima. Biološki tretmani su isplativiji i „prijateljski za okolinu“, a kao krajnji rezultat kontaminant se potpuno razgrađuje ili se dobijaju jedinjenja sa smanjenom toksičnošću.

Zbog velikog biodiverziteta, visokog kataboličkog potencijala i razvijene sposobnosti za adaptaciju, mikroorganizmi mogu da koriste naftu i naftne derivate kao izvore ugljenika i energije i metabolički ih uklone iz zagađene životne sredine^{5,6}. Zemljište i sediment predstavljaju stanište velikog broja raznovrsnih mikroorganizama, od jednostavnih prokariotskih bakterija i cijanobakterija do kompleksnih eukariotskih organizama, gljiva i protozoa. Značaj ovih mikroorganizama je prepoznat poslednjih decenija i njihov potencijal se koristi za degradaciju naftnih derivata (benzin, kerozin, dizel i sl.). Pre procesa bioremedijacije potrebno je utvrditi broj autohtonih mikroorganizama u sedimentu, a zatim ih okarakterisati biohemijskim testovima i molekularnim metodama. Zimogeni mikroorganizmi su komponenta autohtonih mikroorganizama koji mogu da koriste neuobičajene supstrate (kontaminante) kao izvor ugljenikovog atoma. Neki rodovi bakterija, kao što su *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, gljiva - *Candida*, *Aureobasidium* i *Aspergillus* sa visokom efikasnošću razlažu naftu i naftne derivate^{4,5,7}.

U ovom radu praćene su promene u sadržaju mineralnih ulja kao i aktivnost mikroorganizama koji imaju sposobnost da ih razgrađuju, tokom procesa remedijacije.

Metode

Preliminarnim ispitivanjima lokaliteta koji se nalazi u blizini termoelektrarnog objekta utvrđeno je postojanje zagađenja mineralnim uljima kako u sedimentu tako i u podzemnim vodama i postojanje potrebe za sanacijom i remedijacijom terena. Postupak bioremedijacije obuhvatao je i podzemne vode i sediment, jer su obe sfere životne sredine u kontaktu i moraju se istovremeno tretirati.

Proces bioremedijacije sedimenta i podzemnih voda sastojao se iz tri faze 1. biostimulacije - ubrizgavanje kiseonika i hranljivih supstanci; 2. bioaugmentacije - ubrizgavanje zimogenog konzorcijuma mikroorganizama; 3. uspostavljanja recirkulacije u zatvorenom bipolarnom sistemu. Recirkulacija je uspostavljena ispumpavanjem kontaminirane podzemne vode kroz crpni bunar koji se nalazio nizvodno od injekcionog bunara. Voda je zatim filtrirana prolaskom kroz adsorpcione kolone koje sadrže prirodne neorganske hidrofbne adsorbente na kojima se stvara biofilm od mikroorganizama koji razgrađuju kontaminante. Nakon toga, voda se vraća kroz injekcioni bunar u podzemni rezervoar. Neophodno je da prostor između injekcionog i crpnog bunara obuhvata kontaminirani prostor, vodeći računa o toku podzemnih voda^{8,9}.

Za monitoring tokom procesa bioremedijacije odabrana je jedna mikrolokacija u neposrednoj blizini uljne kanalizacije. Utvrđeno da je najveće zagađenje na datoj mikrolokaciji na dubini 0-15 m. U bioremedijacionom postupku upotrebljen je konzorcijum zimogenih mikroorganizama, koji je izolovan iz kontaminirane sredine sa mikrolokaliteta. Konzorcijum je umnožen u laboratorijskim uslovima, a zatim i u mobilnom bioreaktoru. Početna inokulacija bunara koji ispiraju mikrolokaciju urađena je na početku procesa bioremedijacije, sa $1,40 \times 10^9$ CFU (colony forming units) / mL UBA (ukupnih hemoorganoheterotrofnih, aerobnih i fakultativno anaerobnih, mezofilnih bakterija) i $1,05 \times 10^8$ CFU / mL DUV (bakterija koje degradiraju ugljovodonike). U toku perioda bioremedijacije od novembra 2017. (T_0) do juna 2018. godine (T_{210}) uzorkovanje je urađeno tri puta sa dubine 0-15 m, na početku praćenja u periodu T_0 , nakon 90 dana (T_{90}) i 210 dana (T_{210}). Kompozitni uzorci sedimenta su uzimani u sterilne boce, transportovani i čuvani na 4 °C za dalje analize. Metodom serijskog razblaženja je u kompozitnim uzorcima ispitivan broj mikroorganizama.

Određivanje broja mikroorganizama u kompozitnim uzorcima sedimenta

U toku procesa bioremedijacije praćen je broj ukupnih hemoorganoheterotrofnih, aerobnih i fakultativno anaerobnih, mezofilnih bakterija gajenjem na hranljivom agaru (pepton 1, 15 g; mesni ekstrakt, 3 g; natrijum hlorid, 5 g; dikalijum hidrogenfosfat, 0,3 g; agar, 18 g; destilovana voda, 1 L) i bakterija koje razgrađuju ugljovodonike gajenjem na mineralnom agaru (amonijum nitrat, 1 g; dikalijum fosfat, 0,25 g; ekstrakt zemlje, 50 mL; agar, 16 g; destilovana voda, 1 L) sa dodatkom 2 g / L dizela kao izvorom ugljovodonika¹⁰. Specifične vrste bakterija roda *Pseudomonas* izolovane su na agaru za izolovanje *Pseudomonas* (pepton, 20 g; magnezijum hlorid, 1,4; kalijum sulfat, 10 g; irgasan, 25 mg; agar, 13,6 g; glicerol, 20 mL)¹¹, a M3 (kalijum dihidrogenfosfat, 0,466 g; natrijum hidrogenfosfat, 0,732 g; kalijum nitrat, 0,01 g; natrijum hlorid, 0,29 g; magnezijum sulfat, 0,1 g; kalcijum karbonat, 0,02 g; ferosulfat heptahidrat, 200 µg; cink sulfat heptahidrat, 180 µg; mangan sulfat tetrahidrat, 20 µg; natrijum propionat, 0,2 g; agar, 18 g; destilovana voda, 1 L) podloga je korišćena za bakterije rodova *Nocardia* i *Rhodococcus*¹². Određivanje UBA i DUV je urađeno u triplikatu.

Određivanje ukupnih ugljovodonika mineralnih ulja u kompozitnim uzorcima sedimenta

Sadržaj mineralnog ulja u kompozitnim uzorcima sedimenta praćen je po metodi ISO 16703¹³. Uzorci su analizirani na gasnom hromatografu Agilent 7890A sa FID detektorom, sa kolonom HP-5, 30 m dužine i dijametrom 0,32 mm. Debljina stacionarne faze je bila 0,25 µm, a noseći gas vodonik sa brzinom protoka 2 mL / min. Početna temperatura je bila 40 °C, temperatura injektora 250 °C, a detektora 300 °C. Porast temperature je bio 4°C / min, a zadržavanje na svakom temperaturnom nivou jedan minut. Obrada snimljenih hromatograma urađena je u programu ChemStation, Agilent Technologies. Vrednosti su izraženi kao mg / kg suve supstance (mg / kg S.S.). Sva merenja su urađena u triplikatu.

Rezultati i diskusija

Proces bioremedijacije na zagađenoj lokaciji je trajao 210 dana. U ovom radu prikazana je uspešnost bioremedijacije na mikrolokalitetu u neposrednoj blizini uljne kanalizacije, praćenjem smanjenja koncentracije zagađivača, tj. ukupnog sadržaja mineralnih ulja u kompozitnim uzorcima sedimenta i broja mikroorganizama.

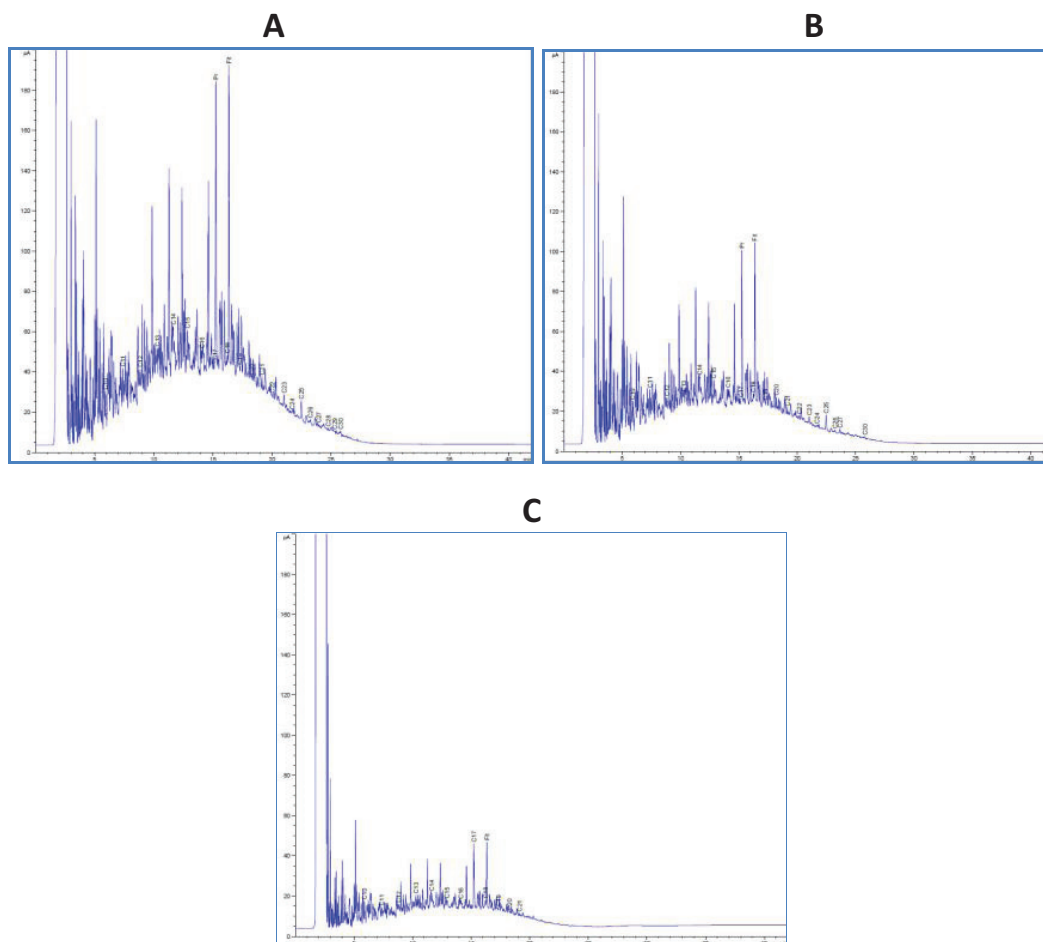
Na zagađenoj mikrolokaciji nakon početne inokulacije, određen je broj UBA i DUV (Tabela 1.) u sedimentu na dubini 0-15 m, u periodu od 210 dana. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija nakon 90 dana bioremedijacije je niži u odnosu na početnu vrednost kada je vrednost mineralnih ulja visoka. Nakon 210 dana se broj UBA i DUB smanjuje u odnosu na početni broj. Ipak, udeo DUV u UBA u toku 90 dana značajno raste, u nultom danu je 0,14 %, a u 90. danu 10 %. U periodu do 210. dana njihov udeo ponovo opada, na 2,25 %. Dominantni rodovi su *Pseudomonas* ($2,20 \times 10^3$ - $5,50 \times 10^4$ CFU / g), *Nocardia* i *Rhodococcus* ($2,30 \times 10^3$ - $3,60 \times 10^5$ CFU / g) što je u skladu sa literaturom⁵.

Tabela 1. Broj ukupnih UBA i DUV, količina mineralnog ulja u tri vremenska perioda bioremedijacije

Vreme trajanja bioremedijacije	UBA (CFU / g)	DUV (CFU / g)	Mineralno ulje, mg / kg S.S.
T ₀	$3,26 \times 10^8$	$4,56 \times 10^5$	3660
T ₉₀	$1,00 \times 10^5$	$5,80 \times 10^4$	2275
T ₂₁₀	$5,55 \times 10^4$	$1,25 \times 10^3$	1324

Sadržaj mineralnih ulja u kompozitnim uzorcima sedimenta praćen je u toku procesa bioremedijacije, na početku, nakon 90 i 210 dana. Koncentracije su iznosile na početku bioremedijacije 3660 mg / kg S.S., nakon 90 dana koncentracija je opala za 37,84 %, a 210. dana je dalje smanjena za 63,82 % u odnosu na početnu vrednost. Ovi rezultati ukazuju da su mikroorganizmi koji razgrađuju ugljovodonike sa visokom efikasnošću razgradili mineralno ulje. Stopa degradacije je iznosila 0-90 dana 15,39 mg / (kg dan), 90-210 dana 7,42 mg / (kg dan). Iz količine mineralnog ulja, stope degradacije i udela DUV u UBA uočavamo da su se faze prilagođavanja i adaptacije konzorcijuma i faza intenzivne razgradnje odvijale od 0-90 dana, dok je u periodu 90-210. dana usledila faza usporene razgradnje¹⁴.

Na hromatogramima (Slika 1. A-C) se uočavaju signali u opsegu C10-C28. Na osnovu ovog rezultata, utvrđeno je da je glavna vrsta kontaminanata prisutnih na mikrolokaciji mineralno ulje, frakcija dizel. Njihova količina se sa dužinom bioremedijacije smanjuje. Visoki signali koji potiču od izoprenoidnih ugljovodonika pristana (C19) i fitana (C20), služe kao biomarkeri nafte i njenih derivata, osim benzina¹⁵. Ovi biomarkeri se smanjuju na hromatogramima B i C što dodatno potvrđuje uspešnost bioremedijacije.



Slika 1. Gasni hromatogrami kompozitnih uzoraka sa mikrolokacije u toku perioda bioremedijacije
A – T₀; B - T₉₀, C - T₂₁₀.

Zaključak

U radu je demonstrirana uspesnost in situ bioremedijacije mikrolokaliteta u blizini termoenergetskog izvora. Udeo mikroorganizama koji razgrađuju mineralno ulje u ukupnom broju mikroorganizama prvo raste pa opada, a količina mineralnog ulja u toku 210 dana bioremedijacije opada na čak 36,18 % od početne vrednosti.

Zahvalnica: Ovaj rad je finansiran u okviru projekta III43004 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja.

***In situ* bioremediation of sediment contaminated with mineral oil**

Introduction: Pollution with petroleum and its products, such as diesel and mineral oils, of water, soil and sediment may occur during the exploitation, transport and storage. It poses a high risk to the environment and human health. Bioremediation is a green technology that removes the pollution from contaminated area in the environment using the catabolic potential of microorganisms and their developed adaptation capabilities. Before the bioremediation process, it is necessary to determine the type of pollution and the number of autochthonous microorganisms. Preliminary research carried out at the contaminated site confirmed the existence of petroleum pollution both in sediment and in groundwater.

Objectives: In this paper changes in the content of mineral oil and the activity of microorganisms degraders during the remediation process were monitored.

Methods: Composite samples were examined three times during 210 days the bioremediation process, at the contaminated site. During the bioremediation process, the number of microorganisms was monitored and microbes degraders of mineral oils were selected. The content of mineral oils in the sediment was also monitored during the bioremediation process, as a measure of the efficiency of the bioremediation process. The changes during the bioremediation process were monitored at the beginning of the process, after 90 and 210 days of bioremediation.

Results: Number of total and microorganisms degraders significantly decreased during the bioremediation. The share of degraders in the total number of microorganisms first increases and then decreases. The amount of mineral oils also decreased, for 63.82 % after 210 days of bioremediation process.

Conclusion: The results indicate that microorganisms degraders with high efficiency have degraded mineral oil. From the amount of mineral oil, degradation rates and level microbes degrades in the total number of microorganisms, we note that the stages of adaptation of the consortium and intensive decomposition phases were in the range of 0-90 days, followed by a slow decomposition phase in the period of 90-210 days.

Literatura

1. D. Tomasevic, M. Dalmacija, M. Prica, B. Dalmacija, Dj. Kerkez, M. Bečelić-Tomin, S. Roncevic, *Chemosphere*, **92** (2013) 1490 (<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.03.063>)
2. J. Spasojević, S. Maletić, S. Rončević, D. Radnović, D. Čučak, B. Dalmacija, *Journal of Hazardous Materials*, **283** (2015) 60 (<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.09.013>)
3. S. Rončević, J. Spasojević, S. Maletić, J. Molnar Jazić, M. Kragulj Isakovski, J. Agbaba, M. Grgić, B. Dalmacija, *Environmental Science and Pollution Research*, **23** (2016) 3239 (<https://doi.org/10.1007/s11356-015-5566-4>)
4. V. Beškoski, G. Gojgić-Cvijović, J. Milić, M. Ilić, S. Miletić, B. Jovančičević, M. Vrvic, *Hemijska industrija*, **66** (2012) 275 (<https://doi.org/10.2298/HEMIND110824084B>)
5. N. Marić, R. Petrović, Z. Nikić, V. Beškoski, P. Papić, I. Matić, M. Vrvic, *Zaštita materijala*, **58** (2017) 445
6. A. Kostić, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2007.
7. V. Beškoski, G. Gojgić-Cvijović, J. Milić, M. Ilić, S. Miletić, T. Šolević, M. Vrvic, *Chemosphere*, **83** (2011) 34 (<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.020>)
8. N. Marić, Doktorska disertacija, Rudarsko-geološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2016.
9. N. Marić, M. Ilić, S. Miletić, G. Gojgić-Cvijović, V. Beškoski, M. Vrvic, P. Papić, *Environmental Earth Sciences*, **74** (2015) 5211 (<https://doi.org/10.1007/s12665-015-4531-3>)
10. C. Löser, H. Seidel, A. Zehnsdorf, U. Stottmeister, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49** (1998) 631 (<https://doi.org/10.1007/s002530051225>)
11. C.H. Collins, P.M. Lyne, J.M. Grange, J.O. Falkinham (Eds). *Microbiological Methods*, eighth edition. Arnold, London, 2004, p. 1 (ISBN 0 340 80896 9)
12. T. J. Rowbotham, T. Cross, *J. Gen. Microbiol.*, **100** (1977) 231 (<https://doi.org/10.1099/00221287-100-2-231>)
13. ISO 16703: Soil quality – Determination of content of hydrocarbon in the range C₁₀ to C₄₀ by gas chromatography (2004)
14. V. Beškoski, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu, Beograd, 2011.
15. A. Rašović, B. Jovančičević, D. Sladić, Z. Kljajić, G. Scheeder, H. Wehner, *Hemijska industrija*, **56** (2002) 17 (<https://doi.org/10.2298/HEMIND0201017R>)